

Untersuchungen über die Fermente
des Kohlehydratstoffwechsels im Blutserum
und in den Organgeweben des Menschen

von

EVA-MADELEINE HEILMANN

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. S e i t z

=====

Untersuchungen über die Fermente
des Kohlehydratstoffwechsels im
Blutserum und in den Organgeweben
des Menschen.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Eva - Madeleine Heilmann
aus
München

1958



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan : Prof. Dr. W. Büngeler

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 6. 58

Herrn Professor Dr. W. S e i t z möchte ich für die Überlassung des Themas, sowie für die Ermöglichung der experimentellen Arbeiten in seinem Laboratorium danken.

Frau Dr. med. A. E n g e l h a r d t möchte ich für die wertvollen Anregungen und Unterstützungen bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Disposition.

A. Allgemeine Vorbemerkungen

B. Eigene Untersuchungen:

Zur Methodik

Prinzip und Durchführung der Methoden:

1. Die Milchsäure-Dehydrogenase
2. Die Äpfelsäure-Dehydrogenase
3. Die Aldolase
4. Die Glycerophosphat-Dehydrogenase
5. Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase
und Phosphatübertragendes Ferment I
6. Die Glutaminsäure-Dehydrogenase

Berechnung der Enzymaktivitäten

Vorbereitung des Testes, Gewinnung des Testmaterials

Gewinnung des Serums

Spezifität des Testes

Stabilität der Serumfermente

Durchführung der Untersuchungen

Ergebnisse der Normalseren

Ergebnisse der pathologischen Seren

Ergebnisse der Körpergewebe und des Liquors

C. Diskussion

D. Zusammenfassung

Fermentschema

Tabellen der Normalseren

Tabelle der pathologischen Seren

Tabelle der Absolutwerte der Gewebe und Körperflüssigkeiten

Tabelle der Relativwerte der Gewebe und Körperflüssigkeiten

Literaturverzeichnis

Allgemeine Vorbemerkungen:

Bestimmungen der Enzymaktivitäten wurden bisher vorwiegend an tierischem Material durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich aber nicht ohne Weiteres auf menschliche Verhältnisse übertragen. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, Fermente nachzuweisen, die im menschlichen Serum erscheinen, also nicht zellgebunden sind. Da in umfangreichen Arbeiten bereits Intermediärprodukte des Kohlehydrat-Abbaues im Blut und Serum gefunden wurden, z. B. Brenztraubensäure (1, 2), Zitronensäure (3), Milchsäure (4), Äpfelsäure (5), lag es nahe nach Fermenten der Glykolyse im Serum zu suchen. Von B. HESS (6) konnten folgende Fermentaktivitäten im Serum nachgewiesen werden: Milchsäure-Dehydrogenase (MDH), Äpfelsäure-Dehydrogenase (ADH), Alpha-Glycerophosphat-Dehydrogenase (Baranowski-Enzym), Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (PGADH), Trioseisomerase, Pyruvat-Kinase, Phosphoglycerat-Kinase. Die erwähnte Arbeit befasst sich hauptsächlich mit dem Verhalten der MDH bei Lebererkrankungen. Ebenfalls im Serum von Leberkranken führte F. H. BRUNS (7-10) Bestimmungen der Aldolase-Aktivität auf chemischem Wege durch. Die MDH-Aktivität im Rinder-Blutserum verschiedener Organe wurde von J. HOF und I. WOLLER (11) vergleichend bestimmt. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Milzvenenblut einerseits und Carotis- Herz- und Lebervenenblut andererseits. Das spricht dafür, daß beim physiologischen Abbau roter Blutkörperchen Fermente ins Serum gelangen.

Vorliegende Arbeit soll einen Überblick über die Aktivitäten einiger Serum-Fermente der Glykolyse unter physiologischen Bedingungen geben. Die Werte werden mit den Aktivitäten in Erythrocyten, Leukocyten, Liquor, Muskel und Leber verglichen.

Zur Methodik:

Die Bestimmungen der Enzymaktivitäten im Serum wurden mit Hilfe der Methodik des optischen Testes nach WARBURG (12) ausgeführt. 1935 entdeckte WARBURG, daß die reduzierte Form der Pyridincofermente durch eine charakteristische Absorptionsbande im Ultraviolett bei $345\text{ m}\mu$ ausgezeichnet ist, während das nicht hydrierte Coferment bei diesen Wellenlängen nicht absorbiert. Das hydrierte Diphosphopyridinnucleotid DPN ist am Ablauf einiger enzymatischer Reaktionen beteiligt. Aus der Änderung der Extinktionen im UV (bei 366 oder $334\text{ m}\mu$) lassen sich die Aktivitäten der zugehörigen Enzymsysteme, sowie die Konzentration der an der Reaktion beteiligten Substrate mit grosser Genauigkeit berechnen. (Die katalytische Wirkung des DPN kommt dadurch zustande, dass sich die spezifischen Proteine mit dem DPN zu undissoziierten Komplexen verbinden, die dann mit dem Substrat in Reaktion treten.)

Die Geschwindigkeit der Zu- oder Abnahme der Lichtextinktion gilt als Mass für die Enzymaktivität.

Es sind nur wenige enzymatisch gesteuerte Prozesse des gesamten Kohlehydrat- und Eiweisstoffwechsels bekannt, die

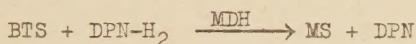
unter Mitwirkung des hydrierten Cofermentes DPN vor sich gehen. Hiervon wurden folgende Enzyme zur Prüfung auf ihr Vorkommen im Serum vorgesehen: 1. Milchsäure-Dehydrogenase, 2. Äpfelsäure-Dehydrogenase, 3. Aldolase, 4. Glycerophosphat-Dehydrogenase (Baranowski-Enzym), 5. Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, 6. Phosphatübertragendes Ferment I, 7. Glutamin-Dehydrogenase.

Prinzip und Durchführung der Methoden:

Die Stellung der einzelnen Fermente geht aus dem nachfolgenden Fermentschema hervor.

1. Die Milchsäure-Dehydrogenase MDH

Die Milchsäure-Dehydrogenase reduziert Brenztraubensäure BTS zu Milchsäure MS, gleichzeitig wird DPNH_2 zu DPN oxydiert nach dem Reaktionsschema:



Setzt man einer Lösung, die BTS und DPN-H_2 enthält MDH zu, so läuft die Reaktion unter Bildung von DPN und Milchsäure vollständig von links nach rechts ab. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite der Milchsäurebildung. Hierdurch lässt sich erklären, weshalb in den Geweben gegenüber der Brenztraubensäure ein ständiger Überschuss an Milchsäure besteht. Beim Ablauf des Prozesses in der Testlösung wird das hydrierte DPN oxydiert, gleichzeitig verschwindet die Lichtabsorption bei $366 \text{ m}\mu$. Als Mass für die Enzymaktivität der Testlösung gilt die Geschwindigkeit der Abnahme

der Lichtextinktion. Die ersten spektrophotometrischen Untersuchungen von v. EULER und Mitarbeitern (13), sowie von O. MEYERHOF und OHLMEYER (14) wurden von KUBOWITZ und OTT (15) erweitert. Hierbei wurden optimale Bedingungen für die Durchführung der Bestimmung angegeben.

Testlösung für den MDH - Test:

1,00 ccm m/10 Na-Pyrophosphat pH 8,3
1,37 " aqua dest.
0,10 " DPN-H₂ = 0,45 mg Nucleotid
0,30 " m/10 brenztraubensaures Na

Dieser Test von KUBOWITZ und OTT wurde von uns übernommen und nach geringfügigen Änderungen wie folgt durchgeführt:

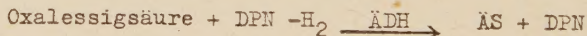
1,00 ccm m/10 Na-Pyrophosphat pH 8,3
1,20 " aqua dest.
0,15 " m/10 brenztraubensaures Na
0,05 " DPN-H₂ (c = 10)
0,10 " Serum
2,50 ccm Testvolumen

Für die Überlassung der Arbeitsvorschrift sind wir Herrn W. Christian & Organ. Chem. Institut der Universität Freiburg zu grossem Dank verpflichtet.

2. Die Äpfelsäure-Dehydrogenase ADH

Die Äpfelsäure-Dehydrogenase katalysiert folgende

Reaktion:



Wir haben die Bestimmung der Aktivität bei nachfolgender

Testzusammenstzung durchgeführt:

1,85 ccm m/10 Na-Pyrophosphat pH 8,3
0,05 " DPN-H₂ (c = 10)
0,50 " Serum
0,10 " Oxalessigsäure
2,50 ccm Testvolumen

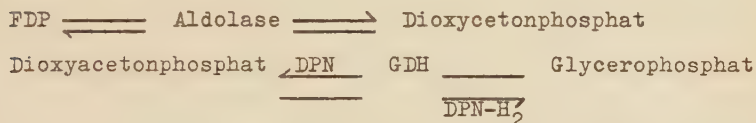
Die für jede Versuchsreihe frisch angemachte Oxalessigsäure wird erst nach Ablauf der Reaktion $\text{BTS} \longrightarrow \text{MS}$ der Testlösung zugesetzt.

3. Die Aldolase

MEYERHOF und LOHMANN (16) entdeckten dieses Ferment und isolierten die Reaktionsprodukte. Die Aldolase katalysiert die Aufspaltung des Hexose-1,6 Diphosphats zu Dioxyacetonphosphat und 3-Glycerinaldehydphosphat. Da diese Reaktion ohne das Pyridincoferment abläuft, wurde der Test gekoppelt mit einer DPN-abhängigen Reaktion:

$$\text{Dioxyacetonphosphat} + \text{DPN-H}_2 \longrightarrow \text{Glycerinaldehydphosphat} + \text{DPN}$$

Reaktionsschema:



Zusammensetzung unserer Lösung für den Aldolase - Test:

1,74	ccm	m/20 Triäthanolaminpuffer	pH 7,4
0,05	"	DPN-H ₂ (c = 10)	
0,10	"	Trilohn 1 %ig	
0,01	"	Baranowski-Enzym(GDH) 1 : 35 verdünnt (Böhringer)	
1,00	"	Serum	
0,10	"	FDP Böhringer f. Ald. Test	
3,00	ccm	Testvolumen	

Wie bei den übrigen Aktivitäts-Bestimmungen wurde das spezifische Substrat, in diesem Falle FDP, erst nach Ablauf der Reaktion BTS → MS hinzugefügt.

WARBURG und CHRISTIAN (17) haben den Aldolase-Test gekoppelt mit der Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase-Bestimmung durchgeführt. Zur Aldolase-Bestimmung wurde von WARBURG (18) folgende Testzusammensetzung angegeben:

1,75	ccm	aqua dest.
0,10	"	DPN (c = 6)
0,50	"	Hexosediphosphorsaures Na pH 7,4
0,30	"	Glykokoll
0,30	"	Arsensaures Na 5,8 %
0,05	ccm	Oxydierendes Gährungsferment

Diese Methode hat WARBURG (19) später in seiner Arbeit über Zymohexase und Asciteszellen modifiziert: Die Wellenlänge wurde von 340 m μ auf 366 m μ abgeändert, zur Bindung von Kupferspuren trat Thioharnstoff an die Stelle von Glykokoll. Nun lautete die Testzusammensetzung:

3,70 ccm aqua dest.
0,50 " Thioharnstofflösung 8%ig
0,25 " DPN - Lösung (6 mg/ccm)
0,10 " Lösung d. oxydierenden Fermentes (4,35 mg/ccm)
0,20 " Na-Arseniat 5,4%ig
0,05 " Ascites - Serum
0,20 " m/10 Hexosediphosphorsaures K pH 7,4

In jüngster Zeit gab BÜCHER (20) folgende Zusammensetzung des optischen Testes an:

$1,5 \times 10^{-7}$ (Mole/ml) DPN-H₂
 4×10^{-6} (Mole/ml) 1,6 Diphosphofructose
 $2 - 2,5 \times 10^{-6}$ (g/ml) Glycerophosphat-Dehydrogenase
 $0,2 - 0,5 \times 10^{-6}$ (g/ml) Trioseisomerase
m/20 Triäthanolamin - HCL -Puffer pH 7,5

Neben der Methodik des optischen Testes ist eine Bestimmung der Aldolase-Aktivität auch auf chemischem Wege möglich, wie sie BRUNS (7-10) bei der Untersuchung der Seren von Hepatitiskranken angewandt hat. Hierbei wurde die Aktivität des Enzyms durch chemische Bestimmungen der aus Fructosediphosphat gebildeten Triosephosphate gemessen. Diese werden nach Aufspaltung des Alkalihydrolysierbaren Phosphors als Dinitrophenylhydrazinderivate der freien Triosen bestimmt.

4. Die Glycerophosphat-Dehydrogenase (Baranowski-Enzym) GDH

Das Baranowski-Enzym ist als DPN-abhängiges Ferment schon bei der Bestimmung der Aldolase-Aktivität erwähnt worden. Sein Reaktionsschema lautet:

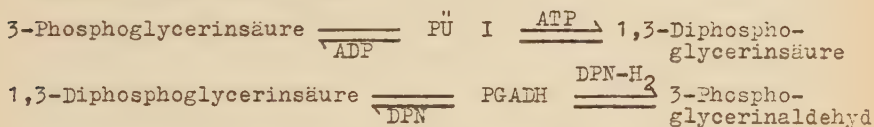


Bei den Versuchen GDH als Ferment im Serum nachzuweisen
verwandten wir folgende Lösung:

2,35 ccm m/20 Triäthanolaminpuffer pH 7,6
0,05 " DPN-H₂ (c = 10)
0,30 " Dioxyäcetonphosphatlösung pH 5-6
0,30 " Serum
3,00 ccm Testvolumen

5. Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase PGADH und Phosphatübertragendes Ferment I PÜ I

Die Enzyme PGADH und PÜ I treten in Erscheinung in
folgendem Reaktionsverlauf:



Um die Aktivität von PGADH bzw. PÜ I zu bestimmen, müssen
3-Phosphoglycerinsäure, ATP sowie DPN-H₂ in der Testlösung
enthalten sein. Da es sich um einen gekoppelten Test handelt,
muss bei der PÜ I-Aktivitätsbestimmung PGADH und umgekehrt
bei der PGADH-Aktivitätsbestimmung PÜ I der Testlösung
zugesetzt werden.

Wir führten den PÜ I Test in folgender Zusammensetzung
durch:

1,48 ccm m/20 Triäthanolaminpuffer pH 7,6
0,20 " ATP - Lösung (10 mg/ccm)
0,05 " DPN-H₂ (c = 10)
0,15 " m/10 Hydrazin-Lösung pH 7,0
0,10 " m/2 Magnesiumsulfat-Lösung in 2m KCl
0,02 " PGADH (10 mg/ml)
0,50 " Serum
0,50 " 3-PGS-Na-Lösung 5%ig
3,00 ccm Testvolumen

Zusammensetzung des PGADH Testes:

2,15	ccm	m/20 Triäthanolaminpuffer	pH 7,6
0,10	"	ATP - Lösung (10 mg/ccm)	
0,05	"	Cystein-Lösung	pH 7.0
0,04	"	m/2 Magnesiumsulfat-Lösung	
0,05	"	DPN-H ₂ (c = 10)	
0,01	"	PÜ I ² (1,5 mg/ml)	
0,50	"	Serum	
0,10	"	3-PGS-Na-Lösung	5%ig
3,00	ccm	Testvolumen	

Die Lösungen von Hydrazin und Cystein wurden erst vor Beginn einer Versuchsreihe mit schwacher Natronlauge neutralisiert. Der Cysteinzusatz ist erforderlich um den Phosphoglycerinaldehyd abzufangen.

Zu beiden Testansätzen wird PGS-Na erst nach Ablauf der Reaktion $BTS \longrightarrow MS$ gegeben.

6. Die Glutaminsäure-Dehydrogenase GsDH

Dieses wichtige Enzym stellt die Verbindung zwischen dem Kohlehydrat- und Eiweisstoffwechsel her. Die Glutaminsäure-Dehydrogenase wurde von WARBURG und CHRISTIAN eingehend untersucht. Auch sie benötigt DPN als H-übertragendes Coferment in folgender Reaktion:



Das physiologische Gleichgewicht liegt ganz auf der Seite der Glutaminsäure. In biologischem Milieu muss das System demnach besonders geeignet sein zur Katalyse der in Richtung von rechts nach links verlaufenden hydrierenden Aminierung der Ketoglutarsäure.

Arbeitsvorschrift:

2,05 ccm	Triäthanolamin-Lösung 36%ig	pH 7,4
0,15 "	Trilon 1%ig	
0,10 "	m/10 α Ketoglutar-saures Na	(Alphaketoglutar-säure)
0,05 "	DPN-H ₂	(c = 10)
0,05 "	3 m Ammoniumacetat	
0,10 "	Serum	
2,50 ccm	Testvolumen	

Für die Überlassung der Arbeitsvorschrift sind wir Herrn Dipl. Chem. Dr. W. Lamprecht, Org. Chem. Inst. der Techn. Hochschule München zu besonderem Dank verpflichtet.

Berechnung der Enzymaktivitäten:

Alle durchgeführten Bestimmungen wurden zum Zeitpunkt To durch Zugabe des spezifischen Substrates zu der enzymhaltigen Lösung gestartet. In Abständen von einer Minute wurde die eintretende Abnahme der Lichtextinktion abgelesen. Die Reaktion wurde 10 - 15 Minuten lang verfolgt. Sämtliche Messungen wurden bei der Wellenlänge 366 m μ und Schichtdicke 1 cm im Photometer Eppendorf durchgeführt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Testvolumen mal } 100}{(60 A) \text{ mal Probe im Test in ccm}} = E / \text{ccm}$$

z. B. Testvolumen 3 ccm

$$\text{Aktivität } E = 0,021 / 9 \text{ Min.}$$

Serum im Test 1,5 ccm

$$\frac{3 \text{ mal } 100}{2700 \text{ mal } 1,5} = 0,066 E / \text{ccm}$$

Äpfelsäure-Dehydrogenase $\frac{10}{A}$ A = Zahl der Minuten, die für eine Extinktionsänderung E = 0,1 benötigt wird.

Vorbereitung des Testes, Gewinnung des Testmaterials:

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde in Team-Arbeit im Verlaufe von 2 Jahren in unserem Labor an folgendem Material von vorwiegend Stoffwechselgesunden durchgeführt: Serum, Erythrocyten, Leukocyten, Muskel, Leber und Liquor. Die Ergebnisse wurden von mir statistisch ausgewertet und tabellarisch zusammengestellt (Tabelle Ia und Ib).

Gewinnung des Serums:

Sämtliche Versuchspersonen ruhten eine halbe Stunde vor der Blutentnahme. Diese erfolgte aus der ungestauten Vene, da es bei gestauter Vene zu unreproduzierbaren Werten kommen kann. Zur Vermeidung der Haemolyse wurde das Blut ohne Spritze entnommen, man ließ es frei aus der Kanüle laufen. Sofort nach Abnahme wurde das Blut eisgekühlt und anschliessend bei 3000 Umdrehungen / Min. zentrifugiert. Durch das schnelle Zentrifugieren sollten Austauschvorgänge zwischen Blut und Serum vermieden werden. Haemolytische Seren wurden verworfen, da sie falsche Werte ergaben. Der Test wurde in der Regel unmittelbar nach der Serumgewinnung durchgeführt. Das Serum stand bis zum Versuchsbeginn im Eisbad. Eine Temperaturangleichung erfolgte durch die sog. "Vorlaufreaktion".

Spezifität des Testes:

Da im Serum immer Brenztraubensäure in ausreichender Menge vorhanden ist, wird nach Zugabe von DPN- H_2 zur Testlösung die Reaktion: Brenztraubensäure MDH → Milchsäure bevorzugt ablaufen und andere, gleichzeitig erfolgende

Reaktionen überdecken. Bis zur vollständigen Umsetzung der vorhandenen BTS kann deshalb nur die Aktivität der MDH bestimmt werden. Die Aktivitäten der anderen, in dieser Arbeit untersuchten Fermente konnten erst mit Hilfe der sog. Vorlaufreaktion bestimmt werden. Hierbei wurden mit Ausnahme des jeweilig spezifischen Substrates, sämtliche Bestandteile der Testlösung in eine Küvette pipettiert. Letztere wurde laufend im Photometer Eppendorf kontrolliert bis keine Extinktionsänderung mehr erfolgte. Nach ca. 45 Minuten war die vorhandene BTS umgesetzt, die gewünschte Reaktion konnte nun durch Zugabe des spezifischen Substrates gestartet werden.

Stabilität der Serumfermente:

a) Testungen der einzelnen Fermente des selben Serums in Abständen von 6 und 12 Stunden zeigten keine Veränderungen der Aktivität. Bei MDH fand sich diese Stabilität auch noch nach 24 Stunden, wohingegen die anderen Fermente, insbesondere ADH nach dieser Zeitspanne schwankende Werte zeigten.

b) Ein und dasselbe Frischblut wurde in vier Portionen geteilt; die erste Menge sofort, die restlichen in Abständen von je 15 Minuten zentrifugiert. Es ergab sich kein Unterschied in der Aktivität.

c) Blutentnahmen an Versuchspersonen in nüchternem Zustand, vor und nach den Malzeiten wurden verglichen.

d) Zu jedem Test wurde ein Leertest angesetzt, der an Stelle des Serums H_2O enthielt.

Durchführung der Untersuchungen:

MDH wurde in 19 Normalseren, sowie in 4 pathologischen Seren bestimmt.

In 24 Normalseren und 11 pathologischen Seren wurde ADH bestimmt.

Die Aldolase-Aktivität wurde in 14 Normalseren, sowie in 8 pathologischen Seren bestimmt.

Insgesamt gelangten 70 verschiedene Seren zur Untersuchung. Hier sind die zahlreichen Vorversuche eingerechnet, die keine verwertbaren Ergebnisse zeigten und daher auch nicht in den folgenden Tabellen erwähnt sind.

Ergebnisse der Normalseren:

Im Normalserum fand sich für MDH ein Mittelwert von 3,74 FE/ml; für ADH von 1,30 FE/ml; für Aldolase von 0,22 FE/ml und für PÜ I von 0,56 FE/ml.

Weder GDH noch GsDH noch PGADH konnten im Serum nachgewiesen werden. Geringe Änderungen der Lichtextinktion waren auf Spuren von Verunreinigungen in den zum Test verwendeten Substraten und Coenzymen zurückzuführen. Reaktionen, welche man in den Vorversuchen dem Baranowski-Enzym und der Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase zugeschrieben hatte, stellten sich als Reaktionen der MDH mit der BTS heraus. Nachdem man dazu übergegangen war, das spezifische Substrat zu jedem Testansatz erst nach vollständiger Umsetzung der BTS

in Milchsäure hinzuzugeben, zeigten die betreffenden Lösungen keine Aktivität der erwähnten drei Fermente.

Ergebnisse der pathologischen Seren:

H. Sch. Diagnose: Cirrhose mit hepatischem Schub

Fermentaktivitäten: MDH 1,26 FE/ml; ADH 1,70 FE/ml

Aldolase 0,18 FE/ml; PÜ I 0,24
FE/ml

F.Z. Diagnose: Leberschaden

Fermentaktivitäten: ADH 1,08 FE/ml; Aldolase 0,25
FE/ml

H.W. Diagnose: Lebercirrhose

Fermentaktivitäten: ADH 1,57 FE/ml; Aldolase 0,31
 FE/ml PÜ I 0,74 FE/ml

Bei allen drei Patienten verhalten sich die getesteten Aktivitäten wie ein Normalserum.

R.H. Diagnose: Hyperthyreose
Fermentaktivitäten: ÄDH 0,83 E; Aldolase 0,25 E;
PÜ I 0,07 E

N.N. Diagnose: Hyperthyreose
Fermentaktivitäten: MDH 1,25 E; ÄDH 1,0 E; PÜ I
0,5 E

Auch bei den beiden Hyperthyreose-Patienten zeigte sich kein Unterschied zu den Normalwerten.

F.A. Diagnose: Sek. Anaemie
Fermentaktivitäten: ÄDH 2,5 E; Aldolase 0,35 E;
PÜ I 1,0 E

Hier war ÄDH etwas erhöht, lag aber noch unter dem Maximalwert der Normalseren. Aldolase entspricht mit 0,35 E dem normalen Maximalwert.

H.U. Diagnose: Essentielle Hypertonie
Fermentaktivitäten: ÄDH 1,17 E; PÜ I 0,65 E

N.W. Diagnose: Morbus Hodgkin
Fermentaktivitäten: ÄDH 1,67 E; Aldolase 0,28 E;
PÜ I 0,74 E

H.St. Diagnose: Lungeninfarkt, Tromboseneigungen
Fermentaktivitäten: MDH 4,16 E; ÄDH 2,08 E; Aldolase 0,25 E

Hier lag eine gesteigerte Aktivität von MDH vor. Jedoch lag sie mit 4,16 E immer noch unter dem Maximalwert von 5,40 E im Normalserum.

H.E. Diagnose: Durchblutungsstörungen
Fermentaktivitäten: ÄDH 3,75 E; PÜ I 1,56 E

ÄDH war bis zum Maximalwert der Normalseren erhöht.

H.B. Diagnose: Morbus Marchia Fava

 Fermentaktivitäten: MDH 27,7 E; ADH 13,3 E

 Aldolase 0,4 E; PÜ I 1,25 E

Dies war der einzige Fall, bei dem sich wirklich signifikante Ergebnisse fanden. Da die Aktivitäten von MDH und ADH um das Neun- bis Zehnfache gesteigert waren, musste das Serum erst mehrfach verdünnt werden, bevor sich verwertbare Ergebnisse erzielen liessen. Doppelbestimmungen und zweimal wiederholte Testungen in einem Abstand von je 4 Tagen ergaben das gleiche Resultat.

Ergebnisse der Körpergewebe und des Liquor:

Der Fermentgehalt der Leukocyten ist wesentlich grösser als der der Erythrocyten. Leuko enthalten etwa 32 mal mehr MDH und ca. 57 mal mehr PÜ I als Ery. Der Aldolase-Gehalt der Ery ist so gering, dass er sich quantitativ nicht ermitteln lässt. PGADH und GsDH sind in den Leuko nur in Spuren, in den Ery überhaupt nicht nachweisbar. Wahrscheinlich ist die Empfindlichkeit der Methode zu gering, um so kleine Enzymmengen noch zu erfassen. Grössere Mengen haemolysierter Ery zum Test zuzusetzen ist wegen der hohen Extinktion des Haemoglobins nicht möglich.

Völlig andere Verhältnisse finden sich in Muskel und Leber. Auf quantitative Vergleiche des Fermentgehaltes der einzelnen Körpergewebe und Flüssigkeiten wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet. Die hohen Aktivitätszahlen sagen daher nicht aus, dass der Muskel quantitativ eine besondere hohe Konzentration der untersuchten Fermente enthält, da die

Werte nicht auf das jeweilige Organtrockengewicht bezogen sind. Die Zahlen zeigen aber deutlich, dass die Muskulatur im Gegensatz zu Serum und Blutzellen reichlich PGADH und auch relativ mehr Aldolase enthält. Leider konnte die Glutaminsäure-Dehydrogenase in der Muskulatur aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Die Leber ist im Gegensatz zu Serum und Blutzellen reich an Aldolase und enthält auch grosse Mengen Glutaminsäure-Dehydrogenase. PGADH ist ebenfalls in der Leber vorhanden, jedoch sind quantitative Zahlenangaben nicht möglich, da die Werte mit Hilfe einer anderen Methode (gekoppelter Test nach WARBURG) gewonnen wurden.

Von besonderem Interesse sind die Liquorbefunde. Diese sehr zellarme Körperflüssigkeit zeigt ein dem Serum gegenüber sehr unterschiedliches Bild. Der Liquor enthält nämlich nur Milchsäure-Dehydrogenase, neben Äpfelsäure-Dehydrogenase, die nicht quantitativ berechnet wurde, jedoch keine Aldolase, PGADH und GSDH. Auch nach Anreicherung des Liquor-Eiweissgehaltes durch Dialyse⁺) liess sich kein weiteres Ferment nachweisen.

Um die hier angedeuteten verschiedenen Fermentrelationen der einzelnen Organe auch rechnerisch zu belegen, ohne auf die technisch schwierige Frage der Bestimmung des Trockengewichtes der in ihrer Konsistenz sehr unterschiedlichen Gewebe eingehen zu müssen, wurden Verhältniszahlen berechnet. Sie beziehen sich auf die MDH-Aktivität, die mit 100 % angenommen wird. Die übrigen Aktivitäten sind im Relativprozent angegeben.

⁺) Wir danken Herrn Dr. Dietrich, Chirurgische Poliklinik der Universität München, für die Durchführung der Dialyse-Versuche.

D i s k u s s i o n :

Diese Arbeit sollte in erster Linie Aufschluss geben über das Verhalten einer Gruppe von Fermenten im Normalserum. Pathologische Fälle wurden fast gar nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen erlauben in dieser Form keine bindenden Schlussfolgerungen zur Frage der Herkunft der Serumenzyme. Sicher ist jedoch, dass es ein sogenanntes "Serumenzymbild" gibt, ähnlich wie man von einem "Serumeiweissbild" spricht, wenn man die Relationen und Konzentrationen der Serumalbumine und Globuline definieren will. Unsere Kenntnisse der Serumenzyme sind aber im Gegensatz dazu noch lange nicht vollständig und ihre Erforschung nicht abgeschlossen. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob die von uns getestete Äpfelsäure-Dehydrogenase ein selbständiges Ferment oder mit der Milchsäure-Dehydrogenase identisch ist. In einem Versuch wurde zum Testansatz für ÄDH statt 0,1 ccm Oxalessigsäure die gleiche Menge BTS gegeben. Es ergab sich eine nur wenig geringere Aktivität als in der gleichzeitig untersuchten üblichen ÄDH-Testlösung. Jedoch lassen vorliegende Versuche die ÄDH als selbständiges Ferment vermuten, da die Aktivitäten der beiden Fermente meist nicht parallel verlaufen. Es ergaben sich im gleichen Serum hohe ÄDH-Werte gegenüber niedrigen MDH-Werten. Durch Versuche mit spezifischen Hemmstoffen liesse sich wahrscheinlich die ÄDH als eigenes Enzym bestätigen.

MDH und ÄDH könnten in der Diagnostik vielleicht eine Rolle spielen, da sich doch einige Unterschiede in den Aktivitäten ergaben (siehe Morbus Marchia Fava). Haemolytische Se-

ren ergaben erhöhte, nicht verwertbare Werte, da die Fermente aus den zerfallenden Blutkörperchen austreten. In dieser Richtung wären auch die Beobachtungen beim Morbus Marchia Fava zu deuten. Infolge Verschiebung des Blut-pH-Wertes kommt es hier zur Haemolyse.

Wir können auf Grund unserer fragmentarischen Untersuchungen nur aussagen, dass das Verhalten des von uns untersuchten Teiles des Serumenzymbildes dem der Blutzellen einigermassen ähnlich ist. Zur Diskussion unserer Befunde müssen noch einige Ergebnisse anderer Arbeiten zitiert werden. Zu diesen gehören die bereits erwähnten Untersuchungen von HOF und WOLLER (11) über den erhöhten MDH-Gehalt des Milzvenenserums. Bei Blutkrankheiten, die entweder mit einer absoluten Zunahme oder gesteigerter Zerfallsbereitschaft von Blutzellen einhergehen steigt die Konzentration bestimmbar, in diesen Blutzellen reichlich vorhandener Enzyme an, so z.B. MDH, ADH und PÜ I bei Leukaemien, pernicioöser Anaemie und haemolytischer Anaemie. Aldolase steigt ebenfalls, aber wesentlich weniger an. Dagegen finden wir bei schweren Leberschäden, entsprechend dem hohen Aldolase- und Transaminase-Gehalt dieses Organs einen sehr ausgeprägten Anstieg derselben Enzyme, im Serum (21,22). Da die Konzentration derselben Enzyme, wie Tierversuche zeigten, im Lebergewebe bei schweren Gewebsschäden abnimmt, dürfte ihre Herkunft aus diesem Organ gesichert sein. Nach neuesten Untersuchungen steigen auch beim Herzinfarkt nicht nur die Serumtransaminasen (23-26), sondern auch die Milchsäure-Dehydrogenase des Serums signifikant an. Dies wird durch die hohe Konzentration dieses Enzyms im Herzmuskel erklärlich.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen die Hypothese aufstellen, dass unter normalen Bedingungen die Zellen der Körperorgane und Gewebe eine sehr konstante Menge von Enzymeiweiss an das Serum abgeben. Ob an dieser Freisetzung die Blutzellen mehr als die übrigen Gewebe beteiligt sind, lässt sich nicht sicher sagen. Erst wenn nachgewiesen ist, dass das Serum genau dieselben Enzyme enthält oder nicht enthält wie die Blutzellen ist unsere Auffassung bewiesen, nach der die grossen Organe ebenso wie die Muskulatur unter physiologischen Bedingungen kein Enzymeiweiss verlieren. Jede Änderung der Enzymkonzentration lässt, wenn kein vermehrter Blutabbau vorliegt, auf eine Zerstörung oder Änderung der Permeabilität der Zellen in vorher intaktem Gewebe schliessen.

Zusammenfassung:

1. In 29 Normalseren und 11 pathologischen Seren wurden die Fermentaktivitäten von MDH, ÄDH, Aldolase und PÜ I nach der optischen Methode von WARBURG untersucht. Die Mittelwerte sowie die Streubreite wurden errechnet und in einer Tabelle zusammengestellt. GDH, PGADH sowie GsDH konnten im Serum nicht nachgewiesen werden.

2. Die Fermentwerte pathologischer Seren zeigten keinerlei Unterschiede gegenüber den Werten Gesunder. Lediglich in einem Fall von Morbus Marchia Fava war die Aktivität der Milchsäure-Dehydrogenase sowie der Äpfelsäure-Dehydrogenase erheblich gesteigert.

3. Die Ergebnisse der Fermentbestimmungen in Erythrocyten, Leukocyten, Liquor, Muskel und Leber wurden statistisch ausgewertet, ihre Absolut- sowie Relativwerte in Tabellen zusammengestellt und mit den Werten des Serums verglichen. Die Liquorbefunde zeigten dem Serum gegenüber ein sehr unterschiedliches Bild, da der Liquor nur Milchsäure-Dehydrogenase enthält. Das "Fermentpattern" der weissen und roten Blutzellen ist dem des Serums weit ähnlicher als das der Leber und der Muskulatur.

Tabelle der Normalseren

Nr.	MDH	ADH	Aldolase	PÜ I
1. E.H.	0,0032/Min 1,36 E	0,044/Min 0,367 E	0,004/Min 0,2 E	
2. B.B.		0,12 /Min 1,0 E	0,005/Min 0,25 E	0,007 /Min 0,34 E
3. D.V.	0,004 /Min 1,7 E	0,008/Min 0,80 E	0,005/Min 0,25 E	0,0047/Min 0,23 E
4. I.A.	0,010 /Min 4,13 E	0,044/Min 0,367 E	0,004/Min 0,2 E	0,005 /Min 0,25 E
5. M.R.		0,009/Min 0,75 E	0,0026/Min 0,13 E	0,0009/Min 0,04 E
6. F.L.		0,0086/Min 0,72 E	0,0038/Min 0,19 E	0,0087/Min 0,45 E
7. I.T.		0,0137/Min 1,14 E	0,0046/Min 0,22 E	0,0048/Min 0,29 E
8. E.M.		0,010 /Min 0,835 E	0,0031/Min 0,156 E	0,0045/Min 0,22 E
9. H.B.		0,020 /Min 1,66 E	0,004 /Min 0,2 E	0,0058/Min 0,29 E
10. M.H.	0,007/Min 2,9 E	0,0085/Min 0,71 E	0,005 /Min 0,25 E	0,0054/Min 0,26 E
11. H.L.		0,020 /Min 1,66 E	0,0054/Min 0,26 E	
12. H.W.		0,15 /Min 0,24 E	0,005 /Min 0,25 E	
13. M.B.	0,005/Min 2,08 E	0,026 /Min 2,31 E		

Tabelle der Normalseren.

Nr.	MDH	ÄDH	Aldolase	PÜ I
14. F.K.		0,020 /Min 1,67 E		0,0124/Min 0,60 E
15. H.B.	0,011 /Min 4,63 E	0,0194/Min 1,57 E		
16. F.P.		0,011 /Min 0,92 E		
17. M.P.	0,013 /Min 5,40 E	0,046 /Min 3,83 E	0,007 /Min 0,35 E	
18. A.E.	0,006 /Min 2,42 E		0,004 /Min 0,2 E	
19. H.S.	0,007 /Min 2,94 E	0,010 /Min 0,83 E		0,020 /Min 1,0 E
20. F.S.	0,009 /Min 3,74 E	0,010 /Min 0,83 E		0,030 /Min 1,6 E
21. W.Sch.	0,007 /Min 2,93 E	0,015 /Min 1,25 E		0,021 /Min 1,04 E
22. D.S.	0,011 /Min 4,63 E	0,030 /Min 2,50 E		0,025 /Min 1,25 E
23. J.L.	0,005 /Min 2,08 E	0,025 /Min 2,08 E		
24. E.H.	0,006 /Min 2,51 E	0,007 /Min 0,58 E		
25. H.H.	0,006 /Min 2,51 E			
26. M.Sch.	0,092 /Min 1,91 E			

Tabelle der Normalseren.

Nr.	MDH	ADH	Aldolase	PÜ	I
27. M.H.	0,0056/Min 1,17 E				
28. A.E.	0,010 /Min 2,08 E				
29. F.Sch.	0,0083/Min 3,3 E	0,017 /Min 1,48 E			

Tabelle der pathologischen Seren.

Nr.	MDH	ÄDH	Aldolase	PÜ I
1. H.Sch. Cirrhose m. hepat. Schub	0,003/Min 1,26 E	0,0016/Min 1,7 E	0,0035/Min 0,175 E	0,0047/Min 0,236 E
2. F.Z. Leberschaden		0,0136/Min 1,08 E	0,0046/Min 0,23 E	
3. H.W. Lebercirrhose		0,019 /Min 1,57 E	0,0062/Min 0,31 E	0,015 /Min 0,74 E
4. R.H. Hyperthyreose		0,010 /Min 0,83 E	0,004 /Min 0,25 E	0,0014/Min 0,07 E
5. N.N. Hyper- thyreose	0,003/Min 1,25 E	0,012 /Min 1,00 E		0,010 /Min 0,50 E
6. P.A. Sek. Anämie		0,030 /Min 2,50 E	0,007 /Min 0,35 E	0,020 /Min 1,00 E
7. H.U. Essent. Hypertonie		0,014 /Min 1,17 E		0,013/Min 0,65 E
8. M.W. M.Hodgkin		0,020 /Min 1,67 E	0,0056/Min 0,28 E	0,015 /Min 0,74 E
9. H.St. Lungen- infarkt	0,010/Min 4,16 E	0,025 /Min 2,08 E	0,005 /Min 0,25 E	
10. H.E. Durchblut. Störungen		0,045 /Min 3,75 E		0,031 /Min 1,56 E
11. H.B. M. Marchia Fava	0,011/Min 27,7 E	0,040 /Min 13,3 E	0,008 /Min 0,4 E	0,025 /Min 1,25 E

Tabelle I a

Fermentaktivitäten in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten.

Absolutwerte in FE +)

Körperflüssigkeit oder Organ	Zahl d. Einzel- werte	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	GsDH
Serum FE/ml	107	3,44 +- 0,34	0,22 +- 0,03	0,88 +- 0,17	-	-
E r y FE/Mill.Zellen	14	0,05 +- 0,005	+	0,027	+	-
Leuko FE/Mill.Zellen	25	1,61 +- 0,02	0,17 +- 0,11	1,55 +- 0,52	-	+
Liquor FE/ml	7	0,47 +- 0,08	-	-	-	-
Muskel FE/g	36	2692,0 +- 497,5	1972,0 +- 156,5	526,0 +- 146,0	1374,0 +- 184,0	0
Leber FE/g Feuchtgew.	14	73,3 +- 21,9	113,6	0	0	489,8 +- 135,0

+) Aktivitätsdefinition nach BÜCHER (21)

- = im Testmaterial nicht vorhanden

+ = nicht exakt messbar, da die Werte zu niedrig liegen

0 = Werte nicht gemessen

Tabelle I b

Fermentaktivitäten in menschlichen
Geweben und Körperflüssigkeiten.

Relativwerte in % (bezogen auf MDH = 100 %)

Körperflüssigkeit oder Organ	Zahl d. Einzel- werte	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	GsDH
Serum	107	100	6	26	-	-
E r y	14	100	+	64	+	-
Leuko	25	100	10	96	-	+
Liquor	7	100	-	-	-	-
Muskel	36	100	73	19	50	0
Leber	14	100	154	0	0	668

- = im Testmaterial nicht vorhanden

+ = nicht exakt messbar, da die Werte zu niedrig liegen

0 = Werte nicht gemessen

Literaturverzeichnis.

- 1.) Klein J.R., Journ. Biol. Chem. 145, 35, 1942
- 2.) Kierk u. Chieffi, Journ. Nutrition 38, 353, 1949
- 3.) Natelson et al., Clin. Invest. 27, 446, 1948
- 4.) Gibbs et al., Journ. Biol. Chem. 144, 325, 1942
- 5.) Hummel J.P., Journ. Biol. Chem. 180, 1225, 1949
- 6.) Hess B. u. E.Gehm, Kli.Wo. 33, 91, 1955 (1955)
- 7.) Bruns F.H. u. W.Puls, Kli. Wo. 32, 656, 1954
- 8.) Bruns F.H. u. W.Jakob, Kli. Wo. 32, 1041, 1954
- 9.) Bruns F.H., Habilschr. Düsseldorf 1953
- 10.) Bruns F.H., Biochem. Z. 325, 532, 1954
- 11.) Hof J. u. I. Woller, Kli. Wo. 34, 98, 1956
- 12.) Warburg O. u. W. Christian, Biochem. Z. 282, 157, 1935
- 13.) v. Euler u. Mitarbeiter, Hoppe Seyler's Z. f. Phys.
Chemie 245, 532, 1954
- 14.) Meyerhof O. u. Ohlmeyer, Biochem. Z. 290, 334, 1937
- 15.) Kubowitz u. Ott, Biochem. Z. 314, 94, 1943
- 16.) Meyerhof O. u. K. Lohmann, Biochem. Z. 271, 89, 1934
- 17.) Warburg O. u. W. Christian, Biochem. Z. 314, 149, 1943
- 18.) Warburg O. u. W. Christian, Biochem. Z. 303, 40, 1939
- 19.) Warburg, Gawehn u. Lange, Z. f. Naturforsch. 109, 1954
- 20.) Beisenherz, Bolze, Bücher, Czock, Gerbade,
Meyer-Arend, Pfleiderer, Z. f. Naturforsch. 109, 1954
- 21.) Molander D.W., Wroblewski F. u. J. S. La Due
J. Labor. a. Clin. Med. 46, 831-839 (1955)
- 22.) Bang N.U. Iversen K. u. St. Madsen, Ugeskr.Læg. 1956,

Literaturverzeichnis.

- 23.) Kattus A.A.jr., Watanabe R., Semenson Ch., Drell W.
u. C. Agress, J. Amer. Med. Assoc. 160, 16-20 (1956)
- 24.) Merrill J.M., Lemley-Stome J., Grace J.jr. u. G.R. Meneely
J. Amer. Med. Assoc. 160, 1454-1456 (1956)
- 25.) Chinsky M., Shagranoff G.L. u. S. Sherry,
J. Labor. a. Clin. Med. 47, 108-118 (1956)
- 26.) Goldstein F., Israel H. L. u. D. Seligson,
New England J. Med., 254, 746-749 (1956)

Lebenslauf

Ich, Eva-Madeleine Constance Heilmann wurde am 28. 3. 33 zu Bamberg in Oberfranken als Tochter des Oberstarztes Dr. Dr. Pankraz Heilmann und seiner Ehefrau Karin geb. Baronesse v. Vietinghoff-Scheel geboren. Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschulen in Köln, Tann / Ndb., Olmütz / Mähren, Brünn / Mähren, sowie Prag. 1943 trat ich in das Lyzeum in Prag II ein, welches ich bis Kriegsende besuchte. Von 1945 - 1950 besuchte ich die Realschulen in Pfarrkirchen / Ndb., Forchheim / Obfr., Simbach / Inn, von 1950 bis 1952 die Oberrealschule in Mühldorf / Obb., wo ich im Juli 1952 die Reifeprüfung bestand. Im November 1952 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München, legte dort nach dem Wintersemester 1954/55 die ärztliche Vorprüfung ab, studierte dann zwei Semester an der freien Universität Berlin, anschliessend weiter in München. Nach dem Wintersemester 1957/58 habe ich das medizinische Staatsexamen und am 10. Juni die mündliche Promotionsprüfung bestanden. Seit 1952 ist mein ständiger Wohnsitz München.

